两个不同年龄段人血浆蛋白质组的整体化学修饰比较

刘永涛[1]，赵敏迪[2]，潘宣圳[1]，高友鹤[1*]
1（生物化学与分子生物学系，基因工程药物及生物技术北京市重点实验室，生命科学学院，北京师范大学，北京 100875）
2（检验医学科，国家老年医学中心，北京医院，北京 100730）

摘要：
目的：蛋白质的化学修饰是指其氨基酸残基或其链末端上参与的共价基团反应，进而使其分子的结构、执行的调控和信息传递的功能得到改变。人血浆蛋白质组中含有的化学修饰种类众多，如磷酸化、甲基化、乙酰化等。方法：本研究采用 LC-MS/MS 技术结合非限制性修饰鉴定算法，比较两组不同年龄阶段人血浆蛋白质组整体的化学修饰水平之间的差异。结果：研究发现在年长组中半胱氨酸的琥珀酰化、磷酸化修饰以及赖氨酸替换为苏氨酸的修饰显著高于年轻组，而赖氨酸的氨甲酰化修饰低于年轻组。半胱氨酸残基中的巯基是形成二硫键、维持蛋白质结构的重要基团，而以上与半胱氨酸相关的修饰涉及巯基的参与。赖氨酸为碱性氨基酸，其氨基上的修饰会改变蛋白质的酸碱性，可能导致蛋白质的结构与功能受到影响。结论：本研究在不同年龄段人群血浆蛋白质组中找到 4 种有显著差异的蛋白质分子修饰与替换类型，推测年长者血液中具有某种修饰蛋白的增多，可能反映出血中失去正常功能的蛋白质增加，这或许是年长者患有代谢性疾病、心脑血管疾病、肿瘤等相关老年性疾病风险的几率高于年轻人的原因之一。
关键词： 血浆 蛋白质组 化学修饰 串联质谱 非限制性修饰鉴定
分类号：Q516 R34

Comparison of global chemical modifications of human plasma proteome at two different age groups

Yongtao Liu[1]，Mindi Zhao[2]，Xuanzhen Pan[1]，Youhe Gao[1*]
1（Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Key Laboratory of Gene Engineering Drug and Biotechnology, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China）
2 （Department of Laboratory Medicine, National Geriatrics Center, Beijing Hospital, Beijing 100730, China）

Abstract:
Objective The chemical modifications of proteins refer to the covalent group reaction involved in its amino acid residues or chain ends, which in turn change

高友鹤 （1964.06— ）男，博士，教授，博士生导师，国家杰出青年科学基金获得者，现任基因工程药物及生物技术北京市重点实验室主任，《Urine》杂志主编。邮箱：gaoyouhe@bnu.edu.cn。本文系国家重点研发计划“蛋白组学数据质量控制关键技术研发与应用示范”及“阿尔茨海默的早期诊断新技术研发”（项目编号：2018YFC0910202 及 2016YFC1306300）的研究成果之一。

the molecular structure and function. There are many types of molecular modifications in the human plasma proteome, such as phosphorylation, methylation, acetylation, etc.

Methods In this study, two groups of human plasma proteome at different age groups were used to compare the global chemical modifications by LC-MS/MS combined with non-limiting modification identification algorithms.

Results A total of 4 molecular modifications were found to have statistical differences, the succinylation and phosphorylation modification of cysteine (Cys, C) and the modification of lysine (Lys, K) modification of lysine with threonine (Thr, T) were significantly higher in the old group than in the young group, while the carbamylation of lysine was lower in the young group. The sulfhydryl in the cysteine residue is an important group to form disulfide bonds and maintain the structure of the protein. All differential cysteine-related modifications may cause structural and functional changes. Lysine is a basic amino acid, and the modification of its amino group will change the charge state of the protein, which may affect the structure and function of the protein.

Conclusions In summary, four types of protein chemical modifications and substitutes were found to be differential in the plasma proteome in different age groups. We speculate that there is an increase in certain modified proteins in the blood of the elderly people which in turn changes the function of those proteins. This may be one of the reasons why elderly people are more likely than young people to be at risk for age-related diseases such as metabolic disease, cerebral and cardiovascular diseases, and cancer.

Keywords Plasma, Proteome, Chemical modifications, Tandem mass spectrometry, Non-limiting modification identification

高友鹤 （1964.06— ）男，博士，教授，博士生导师，国家杰出青年科学基金获得者，现任基因工程药物及生物技术北京市重点实验室主任，《Urine》杂志主编。邮箱：gaoyouhe@bnu.edu.cn。本文系国家重点研发计划 “蛋白组学数据质量控制关键技术研发与应用示范”及“阿尔茨海默的早期诊断新技术研发”（项目编号：2018YFC0910202 及 2016YFC1306300）的研究成果之一。

1 前言

生命体中的生物过程能同时且相互协调的运作，离不开蛋白质所参与的合成、催化与调节反应。蛋白质是一类结构复杂的生物大分子，其高级结构的差异决定了各自所具有不同的生物化学活性，通过蛋白质之间的相互组合成更高级的网络来执行特定的功能[1]。蛋白质的化学修饰是指其氨基酸残基或其链末端上参与的共价基团反应，通常少数的化学结构改变并不影响蛋白质的生物学活性，而被称为蛋白质非必需部分的修饰，但绝大多数情况下分子结构的改变，会显著改变蛋白质物理化学性质，改变了蛋白质的构象，会使蛋白质的活性发生变化，进而使其执行的功能得到改变[2]。所以，即使在蛋白质含量水平没有变化，但如果其化学修饰水平发生了某些微小的变化，也会使蛋白质的功能显著变化，这意味着蛋白质的化学修饰在另一个维度上丰富了蛋白质行使的不同功能。蛋白质的化学修饰对蛋白质功能的影响主要表现在一下三个方面：1.蛋白质即使发生了一种修饰也会对其功能造成影响。2.同一种蛋白质，不同氨基酸发生了同种或不同种修饰对其功能造成的影响也不同。3.同一种蛋白质可能发生多种类型的化学修饰，进而使其参与的生物过程更加多变与复杂[3]。而与蛋白质相关的化学修饰主要有以下几种类型：1.蛋白质的翻译后修饰(Post-translational modification, PTM)[4]，是指蛋白质在翻译后进行的化学修饰，翻译后修饰蛋白前体往往是没有生物活性的，通常需要经过特定修饰酶的翻译后修饰加工，才能成为具有功能的成熟蛋白质，行使其具体生物功能[5, 6]。2.蛋白质的化学衍生修饰(Chemical derived modification)是指在蛋白质侧链中引入新的基团或去除原有基团的一类修饰，通常包含自发性非酶促修饰，也有交联剂与人工试剂引入的修饰等。3.氨基酸的替换(Amino acid substitution)，是指蛋白质侧链中原有氨基酸被其他种类氨基酸所替换所引起的蛋白质性质与功能的改变。这些都是会显著影响蛋白质功能的修饰类型。

质谱分析不但能够实现大规模组学数据的采集与深度挖掘，也能够对特定蛋白质的靶向修饰实现准确测定。随着仪器科学的不断发展，超高分辨率及串联质谱技术(LC-MS/MS)为蛋白质组学及其修饰研究提供了更多丰富的信息与数据，这也为准确鉴定蛋白质链中化学修饰位点提供了有力的帮助。通常进行蛋白质组数据分析时需进行物种蛋白质组数据库搜索比对，而基于高分辨的串联质谱是获得大量蛋白质修饰信息的主要方式，在使用搜索引擎进行数据库检索时，通常需要人为设定已知的蛋白质化学修饰类型，这种类型的搜索方式称为限制性搜索，对于样品中蛋白质修饰类型未知，期望寻找新的修饰类型时则显得难以实现[7]。因此，全面、非限制修饰搜索对于了解样品蛋白质组所包含的全部化学修饰信息有着至关重要的地位，Open-pFind 算法是一种开放式序列库搜索算法，其将 UniMod 数据库的信息整合，通过开放式搜索的方式对采集到的质谱数据进行分析处理，得到蛋白质组的整体化学修饰信息[8-10]。

血浆是机体内环境的重要组成部分，起着运输维持机体生命活动所需的物质和体内产生的废物等作用，血浆中蛋白质种类与含量丰富，其成分易受机体的代谢、生理与病理过程影响，细胞与组织中的代谢产物与废物都通过血液进行运输与交换，理论上对血浆蛋白质组学的研究可以反应出在特定阶段机体所处的生理状态。血浆蛋白质组学另一个重要的研究方面便是其化学修饰水平，全面地比较血浆蛋白质组化学修饰水平的变化也将会为研究机体生理方面的变化提供更加丰富的信息[6]。目前，被收录在 UniMod[11]、PSI-MOD、RESID 数据库中的蛋白质化学修饰种类已达 1500 余种，人血浆蛋白质组中含有的化学修饰种类众多，如

在蛋白质 N-末端的乙酰化修饰、侧链中的磷酸化修饰、甲基化修饰、糖基化修饰、泛素化修饰及蛋白质链内与链间的二硫键修饰等。血浆蛋白质组能够反映出年龄与衰老之间的细微状况[12]，作为另一种同样富含蛋白质信息的体液—尿液，通过对其研究发现尿蛋白质组也具有反映出机体衰老信息能力[13]，甚至是饥饿这种常见的生理过程都可以在尿蛋白质组中找到线索[14]，而血浆和尿液整体蛋白质组化学修饰的比较，显示出不同类型的样本间存在修饰的差异[15]。本研究基于人血浆蛋白质组中化学修饰的重要性，通过高分辨串联质谱结合非限定性修饰搜索(Open-pFind)，拟比较两组不同年龄段人血浆蛋白质组整体化学修饰水平的差异。

2 材料和方法

2.1 样品的收集

20 例人的血浆样品从北京医院的检验科收集获得，均为检验科废弃样本，将样品按年龄分成 2 组，年轻组与年长组。样品在检验科样品中随机选择，并且对被采血者的饮食，药物和其他因素没有限制或要求。对废弃样本只提取年龄性别信息。样本信息详见表 1。

表 1. 获得的血浆样品信息统计结果

Table 1. Statistical data of plasma samples

样品类型	年轻组血浆	年长组尿液
样品数量（n）	10	10
性别：		
男性	2	3
女性	8	7
年龄：		
平均值	31.8 ± 4.19	59.3 ± 3.46
范围	26-37	56-66

2.2 蛋白质样品制备和胰蛋白酶酶解

血浆经全血抗凝处理后离心得到，血浆样品（n = 20）用 Milli-Q 水稀释 40 倍，随后取用 100 μL 进行后续实验。使用 20 mmol / L 的二硫苏糖醇(DTT)在 37℃下与样品反应 1 h，使蛋白质结构中的二硫键变性，随后添加 55 mmol / L 的碘乙酰胺(IAA)并避光反应 30 min 以使二硫键结合位点烷基化。在-20℃下，用三倍体积的预冷丙酮沉淀上清液 2 h,然后在 4 ℃和 12,000 ×g 下离心 30 min，获得蛋白沉淀。随后将沉淀物重悬于适量蛋白溶解液（8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L DTT 和 50 mmol/L Tris）中。使用 Bradford 分析法测量蛋白质提取液浓度。通过使用滤器辅助样品制备（FASP）的方法，每个样品按 50：1 的比例使用胰蛋白酶（Trypsin Gold, Mass Spec Grade, Promega, Fitchburg, WI, USA）酶解 100 μg 的蛋白质。通过真空离心浓缩仪进行干燥，干燥后的肽段密封至于-80 ℃保存。

2.3 液相色谱-串联质谱（LC-MS / MS）分析和数据库搜索

分析前，需将干燥的多肽样品溶于 0.1%甲酸溶液中，控制终浓度在 0.1

μg/μL，每个样品按 1 μg 多肽质量进行分析：Thermo EASY-nLC1200 色谱系统加载至预柱与分析柱上。通过 Thermo Orbitrap Fusion Lumos 质谱系统(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) 采集蛋白质组数据。液相色谱分析方法：预柱：75 μm×2 cm, nanoViper C18, 2 μm, 100Å; 分析柱：50 μm×15 cm, nanoViper C18, 2 μm, 100Å; 进样体积：10 μL，流速：250 nL/min，流动相：A 相：100%质谱级水(Fisher Scientific,Spain)/1‰甲酸(Fisher Scientific)，B 相：80%乙腈(Fisher Scientific,USA)/20%水/1‰甲酸，120 min 梯度洗脱：0 min，3% B 相； 0 min-3 min，8% B 相；3 min- 93 min，22% B 相；93 min- 113 min，35% B 相；113 min- 120 min，90% B 相； 质谱分析方法，离子源：nanoESI，喷雾电压：2.0 kV，毛细管温度：320 ℃，S-lens RF Level: 30，分辨率设置：一级（Orbitrap）120,000 @m/z 200，二级 30,000（Orbitrap）@m/z 200，母离子扫描范围：m/z 350-1350；子离子扫描范围：start from m/z 110，MS1 AGC: 4e5，电荷范围：2-7，离子注入时间：50 ms，MS2 AGC: 1e5，离子注入时间：50ms，离子筛选窗口：2.0 m/z，碎裂模式：HCD，能量 NCE 32，Data-dependent MS/MS：Top 20，动态排除时间：15 s，内部校准质量数：445.12003。

使用 pFind Studio 软件（3.1.3 版，中国科学院计算技术研究所）对 LC-MS / MS 数据进行无标记的定量分析。目标检索数据库来自 Uniprot 下载的 Homo Sapiens 数据库（更新至 2018 年 10 月），检索时，仪器类型为 HCD-FTMS，酶全特异性为胰蛋白酶，最多有 2 个漏切位点。选择“开放式搜索（open-search）”。筛选条件：在肽水平上的 FDR 小于 1%，在蛋白水平上的 Q 值小于 1%。数据同时使用正向和反向数据库检索策略来分析鉴定数据。

3 结果

3.1 通过使用 Bottom-Up 的蛋白质组学技术对总蛋白进行鉴定

在非标记蛋白质组分析中，通过 LC-MS / MS 分析了 20 个（10/10）样品。 在基于 open-pFind 软件检索数据（.raw）之后，可以在 pBuild 中浏览并导出分析结果。将样品结果进行整理和统计，通过 120 分钟液相梯度的分析，在未经去除高峰度的血浆样品中鉴定出 628-781 种蛋白质（平均值为 724），独有的多肽鉴定水平在 7526-11464 种（平均为 10238）。

3.2 年轻组与年长组血浆蛋白质组翻译后修饰比较

年长组血浆样本累计鉴定出 1169 种修饰(含低丰度修饰的种类，即每种修饰在样品中至少鉴定到 1 次)，年轻组血浆样本累计鉴定出 1154 种修饰(含低丰度修饰的种类)。其中 88%的修饰种类相同，余下 12%差异修饰是相关的（图 1）。

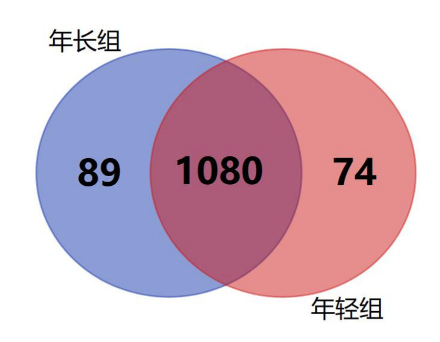


图 1 年长组与年轻组整体血浆蛋白质组分子修饰种类统计

Figure 1 Statistics of the overall plasma proteome chemical modifications in the old and young roups

在两组累计的 163 种独有蛋白质化学修饰中，158 种在组内重复性低于 50%，仅有 5 种满足重现性高于 50%的条件，它们分别是在在年长组出现的四种修饰：Arg->Phe[R]、Arg->Trp[R]、Xlink_DMP[K]、DTT_ST[S]与在年轻组出现的 bisANS-sulfonates[T]修饰。总体来看独有的化学修饰类型都是鉴定数量少，组内重现性较差的分子修饰类型。

将非低丰度的化学修饰（即每种修饰在样品中鉴定到 10 次及以上的）进行统计，并要求每组内鉴定覆盖度大于 50%，在 1080 种化学修饰中共有 120 种满足此条件，将其进行非监督聚类分析，大致可以区分年轻组和年长组样品，但 40%年轻组样品和年长组样品被聚类为一组，未跟其他组内样品归为一类。图 2 展示了具体的样本的非监督聚类结果。筛选差异化学修饰筛选的条件为两组组间 p 值小于 0.05，组内各样品化学修饰数量均值通过总鉴定到的化学修饰谱图数进行归一化计算得到，组间变化倍数大于 1.5 的共有四种修饰：2-succinyl[C]、Lys->Thr[K]、Phospho[C]、Carbamyl[K]，具体信息见表 2.

表 2 年长组与年轻组整体血浆蛋白质组差异分子修饰信息

Table 2 Information on the molecular modifications of the plasma proteome between the older and younger groups

序号	编号*	名称	修饰类型	p 值	年长组均值	年轻组均值	年长组/年轻组
1	957	2-succinyl[C]	化学衍生修饰[16]	0.001	0.00091	0.00046	1.98↑
2	594	Lys->Thr[K]	氨基酸替换	0.003	0.00107	0.00065	1.65↑
3	21	Phospho[C]	翻译后修饰	0.013	0.00087	0.000548	1.59↑
4	1175	Pro->Trp[P]	氨基酸替换	0.042	0.00091	0.00061	1.49↑
5	21	Phospho[S]	翻译后修饰	0.027	0.00105	0.00077	1.36↑
6	64	Succinyl[AnyN-term]	翻译后修饰	0.032	0.00414	0.00317	1.31↑
7	23	Dehydrated[S]	翻译后修饰	0.022	0.0041	0.00446	1.09↓
8	562	Glu->Asp[E]	氨基酸替换	0.029	0.0015	0.00184	1.22↓
9	5	Carbamyl[K]	聚合[17]	0.049	0.01858	0.03081	1.67↓

*编号为 Unimod 数据库收录编号，详情参见：http://www.unimod.org/

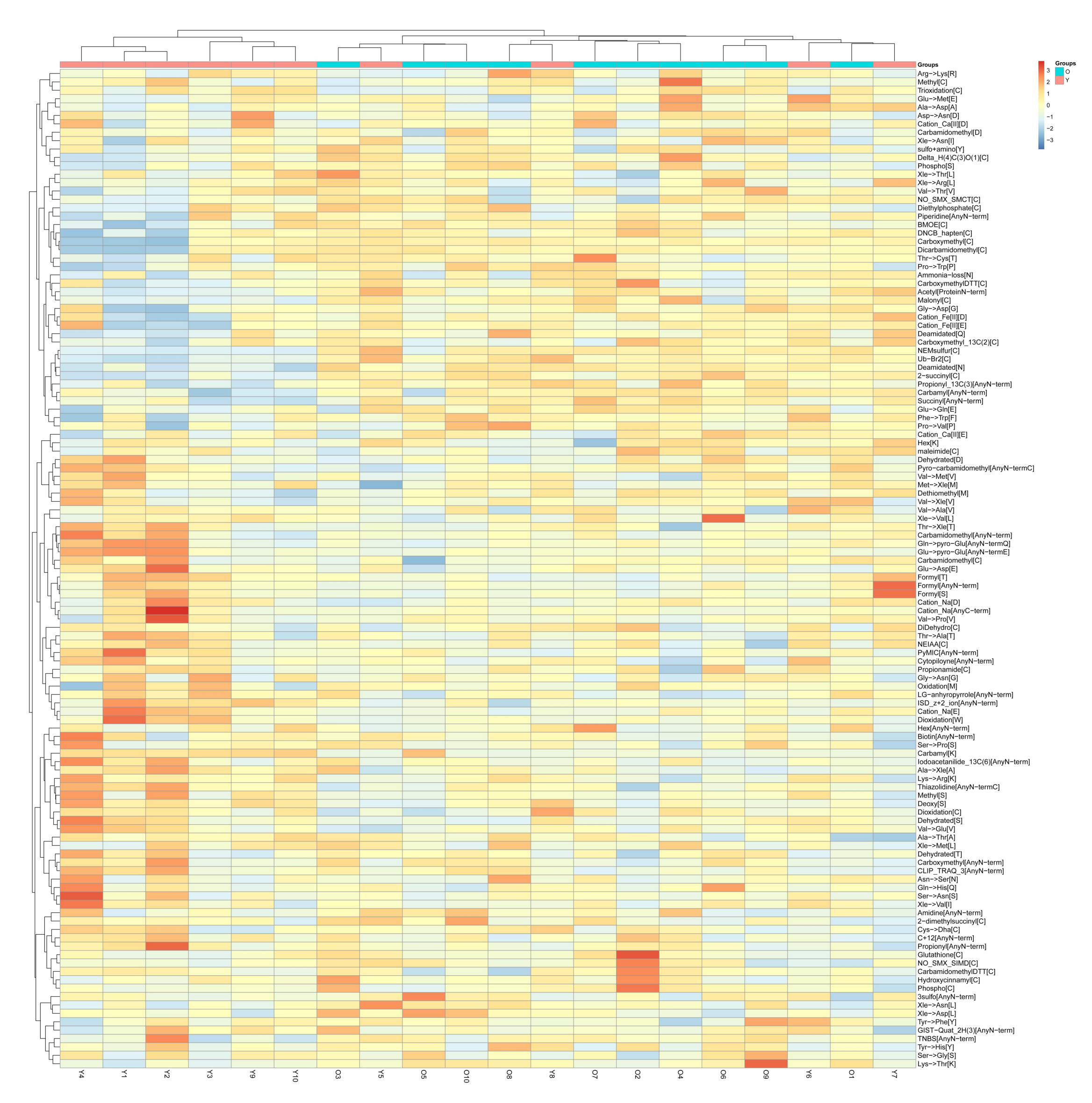


图 2 年轻组与年长组整体血浆蛋白质组分子修饰的非监督聚类分析。粉红色标识（Y）为年轻组样本，浅蓝色表示(O)为年长组样本。横坐标为非监督聚类情况及样品具体信息，纵坐标为具体分子修饰名称。

Figure 2 Unsupervised cluster analysis of overall plasma proteome molecular modifications in the young and old groups. The red mark (Y) is the sample of the young group, and the blue sign (O) is the sample of the old group. The abscissa is the unsupervised clustering and sample specific information, and the ordinate is the specific molecular modification name.

3.3 随机分组检验

将满足差异筛选条件（p 值小于 0.05，变化倍数大于 1.5）的四种差异修饰分别独立进行随机分组检验，验证每种差异修饰的假阳性率。将 10 例年轻组数据与 10 例老年组数据共计 20 组数据随机分成两组，每组 10 例样本，共有 92378 种不同的组合情况（$\frac{1}{2}C_{20}^{10}$），每种形况下的组合通过相同的差异筛选条件进行统计分析，经过穷尽计算统计后得到了四种差异修饰的随机组合情况，详见表 3。

表 3 四种血浆蛋白质中差异化学修饰的随机分组统计结果

Table 3 Random grouping calculation results of 4 different chemical modifications in plasma proteome

序号	名称	随机分组中出现总次数	出现频率	可信度%
1	2-succinyl[C]	4857	0.0525	94.74
2	Lys->Thr[K]	1135	0.0123	98.77
3	Phospho[C]	2126	0.0230	97.70
4	Carbamyl[K]	4664	0.0505	94.95

通过随机分组检验，发现四种差异修饰的随机性均在 5%范围左右，可信度大于 90%，证明四种修饰在不同年龄组之间的差异由随机产生的可能性较低。

4 讨论

蛋白质从翻译组装到最终降解，整个过程会经历许多有毒害的环境，它们会对蛋白质分子进行修饰从而改变蛋白质的结构与功能，这个过程也被称为分子的老化[18]。这些反应主要是由蛋白质上的活性小分子与官能团的非酶结合引起的。修饰分为可逆与不可逆，通过非限定性修饰搜索，在两组不同年龄段人群血浆中发现了几种存在统计差异的蛋白质化学修饰。其中包括半胱氨酸的琥珀酰胺修饰，赖氨酸残基被苏氨酸残基的取代，半胱氨酸的磷酸化，脯氨酸残基被色氨酸残基的取代，丝氨酸的磷酸化，琥珀酰胺的 N 端修饰，丝氨酸的脱水，谷氨酸残基被天冬氨酸残基的取代，赖氨酸的氨甲酰化。其中，半胱氨酸的琥珀酰化、磷酸化修饰以及赖氨酸替换为苏氨酸的修饰在年长组中显著高于年轻组，赖氨酸的氨甲酰化在年轻组中要高于老年组。

半胱氨酸是组成蛋白质中含量最少的几种氨基酸之一，对蛋白质组成的残基统计表明，真核生物的半胱氨酸的平均出现频率约为 2%，同时机体内环境中 70%的还原巯基来源蛋白质[19]。有研究表明蛋白质中半胱氨酸的丰度受蛋白质的功能影响，巯基的高活性使得其容易参与众多化学修饰，反之，也决定了蛋白质结构中的半胱氨酸残基的分布及其拓扑性质，巯基也是形成二硫键、维持蛋白质结构的重要基团[20]。

本研究中所发现的半胱氨酸的琥珀酰化与磷酸化都涉及巯基的参与，进而可能影响二硫键的形成。通过迈克尔加成反应(Michael addition reaction)将富马酸加到蛋白质中某些 Cys 残基的游离巯基位点上从而形成 S-(2-琥珀酸)半胱氨酸[21]。这种修饰最初是在血浆蛋白质(包括白蛋白)中检测到，并通过不可逆反应形成的。该修饰在糖尿病、肥胖症及富马酸水合酶相关疾病和利氏综合征模型中有相关报道。同时也在在高葡萄糖培养基（30 mM，而生理水平为 5 mM）中培养的小鼠 3T3-L1 脂肪细胞中，以及经链脲佐菌素处理的大鼠组织中，均发现琥珀酸蛋白的含量增加[16, 22, 23]。有文献报道，养分(糖类)过量会导致 ATP：ADP，NADH：NAD +和线粒体膜电位升高，而增加的 NADH：NAD +会抑制氧化磷酸化，从而导致线粒体中间体(包括富马酸)的持续积累，继而引起蛋白质琥珀酸化增加。琥珀酸蛋白的积累甚至是由于富马酸水合酶活性降低而引起的。 富马酸水合酶在三羧酸循环中催化富马酸逆转为苹果酸。而重要的是，已知富马酸水合酶中的功能丧失与突变会使受影响的个体易患多种皮肤疾病和子宫平滑肌瘤，以及

遗传性平滑肌瘤和肾细胞癌(HLRCC)[19]。尽管琥珀酸修饰的半胱氨酸等相关蛋白质的确切作用仍有待充分阐明[24-26]，但它与富马酸水合酶相关的癌症反应有关[27-29]。在 Ndufs4 敲除小鼠的脑干中也描述了蛋白质琥珀酸的增加(Leigh 综合征的模型)[30]，因此表明该蛋白质化学修饰类型在这种线粒体疾病的发病机理中具有潜在的作用。Park 等通过与数据库 UniProt 的注解相比，发现检测到的蛋白质琥珀酰化位点中，16 个琥珀酰化位点出现在辅因子绑定区或酶催化区，74 个琥珀酰化位点存在于酶活性位点周围[31]。Baynes 等发现随着年龄增长，人皮肤胶原蛋白中半胱氨酸琥珀酰修饰增加[23, 32, 33]。

半胱氨酸磷酸化是最近在原核和真核系统中被发现，并且被认为在细胞应答的信号传导和调节中起关键作用。由于肽分子中硫代磷酸酯的低化学稳定性，很少研究 Cys 侧链的体内磷酸化作用[34, 35]。半胱氨酸磷酸化是半胱氨酸依赖性蛋白磷酸酶(CDP)的一个重要功能，该酶属于蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)子家族并通过磷酸-半胱氨酸中间体的形成催化磷酸酯键的水解。有研究证明，这种可逆的翻译后调节(PTM)在调节毒力决定因素的表达和细菌对抗生素的耐药性方面是至关重要的。此外，还有研究还表明，半胱氨酸磷酸化，以前被认为是一种罕见的形式，但其在自然界中可能更为普遍，并且可能在各种生物体的生物调节中起着重要的作用。

赖氨酸替换为苏氨酸改变了蛋白质的酸碱性，导致蛋白质的活性与功能受到影响。很早之前的发现血红蛋白上赖氨酸残基被苏氨酸残基取代会使其氧亲和力变低[36]。 Sun WY 等发现第 14 号外显子核苷酸 20040 的突变，苏氨酸在氨基酸 556 处取代 Lys 会使凝血酶原的促凝活性降低 50%[37]。氧的亲和力降低也反映出机体新陈代谢的减缓，这和凝血活性等一系列生理状况改变或许是衰老的早期表现。此外，还有发现人类和小鼠胚胎干细胞需要特定的氨基酸来增殖。mES 细胞需要苏氨酸代谢来完成表观遗传组蛋白修饰。 苏氨酸被转化为甘氨酸和乙酰辅酶 A，甘氨酸的代谢专门调节组蛋白 H3 (H3K4me3)中赖氨酸(Lys)残基的三甲基化[38]。此外我们还发现年长组比年起组中赖氨酸氨基甲酰化修饰的降低，氨甲酰化是一种不可逆的非酶修饰过程，其过程是尿素的分解产物与蛋白质的 N 末端或赖氨酸残基的侧链反应，先前被报道与蛋白质老化有关[39]。赖氨酸氨基甲酰化可以促进金属离子对特定酶活性的配位作用。有研究曾指出尿素水平升高的患者(例如肾病患者)的血浆中氨甲酰化的量显着增加[40]。

衰老是生物随着时间的推移、自发的必然过程，是一种复杂的自然现象，表现为结构的退行性变和机能的衰退，适应性和抵抗力减退。衰老是大多数人类疾病的最大已知危险因素之一：在全球每天约有 15 万人口死亡中，约三分之二是死于与年龄有关的原因。目前衰老的原因尚不确定，当前主流的理论是损伤学说，而 DNA 损伤被认为是癌症和衰老的共同基础，有人认为 DNA 损伤的内在原因是衰老的最重要驱动力。而废物堆积理论认为废物在细胞中的堆积可能会干扰新陈代谢。例如，一种称为脂褐素的废物是通过细胞中将脂肪与蛋白质结合的复杂反应形成的。这些废物以小颗粒的形式积聚在细胞中，随着年龄的增长，其大小会增加。与此同时，结构被破坏甚至是失活的生物大分子的积累可能是导致生物机体与系统逐步失效，这也被认为是衰老的概念。

蛋白质分子衰老除了与生理衰老相关外，还在糖尿病、慢性肾功能衰竭等多种慢性疾病中加速，并参与疾病特定并发症的发生与发展。

通过以上研究，我们在不同年龄段人群血浆蛋白质组中找到了几种有显著差异的蛋白质化学修饰与氨基酸替换类型，这些化学修饰会改变蛋白质的结构和性

质，进而影响蛋白质行使的功能。推测年长者血浆蛋白质中发生某些有害且不可逆化学修饰的逐步积累，可能会反映出机体衰老的进程，或许也是年长者患有衰老相关的老年性疾病，如代谢性疾病、心脑血管疾病和肿瘤风险的几率高于年轻人的原因之一。

参考文献：

[1] Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. Nature, 2016, 537: 347-355

[2] Sakamoto S, Hamachi I. Recent progress in chemical modification of proteins. Anal Sci, 2019, 35: 5-27

[3] Wang C, Zou P, Yang C, *et al.* Dynamic modifications of biomacromolecules: Mechanism and chemical interventions. Sci China Life Sci, 2019, 62: 1459-1471

[4] Minguez P, Parca L, Diella F, *et al.* Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications. Mol Syst Biol, 2012, 8:

[5] Pieroni L, Iavarone F, Olianas A, *et al.* Enrichments of post-translational modifications in proteomic studies. J Sep Sci, 2020, 43: 313-336

[6] Goto T, Kudo Y, Lee SH, *et al.* Efficient strategy for screening chemical modifications on human serum albumin: Use of lc/ms/ms and differential analysis software. Bunseki Kagaku, 2015, 64: 653-659

[7] An Z, Zhai L, Ying W, *et al.* Ptminer: Localization and quality control of protein modifications detected in an open search and its application to comprehensive post-translational modification characterization in human proteome. Mol Cell Proteomics, 2019, 18: 391-405

[8] Li D, Fu Y, Sun R, *et al.* Pfind: A novel database-searching software system for automated peptide and protein identification via tandem mass spectrometry. Bioinformatics, 2005, 21: 3049-3050

[9] Chi H, He K, Yang B, *et al.* Pfind-alioth: A novel unrestricted database search algorithm to improve the interpretation of high-resolution ms/ms data. J Proteomics, 2015, 125: 89-97

[10] Wang LH, Li DQ, Fu Y, *et al.* Pfind 2.0: A software package for peptide and protein identification via tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 2985-2991

[11] Creasy DM, Cottrell JS. Unimod: Protein modifications for mass spectrometry. Proteomics, 2004, 4: 1534-1536

[12] Lehallier B, Gate D, Schaum N, *et al.* Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan. Nat Med, 2019, 25: 1843-+

[13] Li X, Gao Y. Potential urinary aging markers of 20-month-old rats. PeerJ, 2016, 4: e2058

[14] Yuan Y, Z. F, N. Y, *et al.* Urinary protein changes in a rat starvation model. MOJ Proteomics & Bioinformatics, 2017, 6: 00202

[15] L. Y, D. M, P. X, *et al.* Why are there proteins in the urine of healthy people? Sciencepaper Online, 2019, 201911-28:

[16] Blatnik M, Thorpe SR, Baynes JW. Succination of proteins by fumarate: Mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1126: 272-275

[17] Van Driessche G, Vandenberghe I, Jacquemotte F, *et al.* Mass spectrometric identification of in vivo carbamylation of the amino terminus of ectothiorhodospira mobilis high-potential iron-sulfur protein, isozyme 1. J Mass Spectrom, 2002, 37: 858-866

[18] Gillery P, Jaisson S. Usefulness of non-enzymatic post-translational modification derived products (ptmdps) as biomarkers of chronic diseases. J Proteomics, 2013, 92: 228-238
[19] Pe'er I, Felder CE, Man O, *et al.* Proteomic signatures: Amino acid and oligopeptide compositions differentiate among phyla. Proteins, 2004, 54: 20-40
[20] Gunnoo SB, Madder A. Chemical protein modification through cysteine. Chembiochem, 2016, 17: 529-553
[21] Alderson NL, Wang YP, Blatnik M, *et al.* S-(2-succinyl)cysteine: A novel chemical modification of tissue proteins by a krebs cycle intermediate. Arch Biochem Biophys, 2006, 450: 1-8
[22] Thomas SA, Storey KB, Baynes JW, *et al.* Tissue distribution of s-(2-succino)cysteine (2sc), a biomarker of mitochondrial stress in obesity and diabetes. Obesity, 2012, 20: 263-269
[23] Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, *et al.* Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: Succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. J Biol Chem, 2009, 284: 25772-25781
[24] Zheng L, Cardaci S, Jerby L, *et al.* Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. Nat Commun, 2015, 6: 6001
[25] Yang M, Soga T, Pollard PJ, *et al.* The emerging role of fumarate as an oncometabolite. Front Oncol, 2012, 2: 85
[26] Frezza C, Pollard PJ, Gottlieb E. Inborn and acquired metabolic defects in cancer. J Mol Med, 2011, 89: 213-220
[27] Ooi A, Wong JC, Petillo D, *et al.* An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. Cancer Cell, 2011, 20: 511-523
[28] Bardella C, El-Bahrawy M, Frizzell N, *et al.* Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and hlrcc patients is a robust biomarker of mutation status. J Pathol, 2011, 225: 4-11
[29] Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, *et al.* Renal cyst formation in fh1-deficient mice is independent of the hif/phd pathway: Roles for fumarate in keap1 succination and nrf2 signaling. Cancer Cell, 2011, 20: 524-537
[30] Piroli GG, Manuel AM, Clapper AC, *et al.* Succination is increased on select proteins in the brainstem of the nadh dehydrogenase (ubiquinone) fe-s protein 4 (ndufs4) knockout mouse, a model of leigh syndrome. Mol Cell Proteomics, 2016, 15: 445-461
[31] Piroli GG, Manuel AM, Walla MD, *et al.* Identification of protein succination as a novel modification of tubulin. Biochem J, 2014, 462: 231-245
[32] Biatnik M, Thorpe SR, Baynes JW. Succination of proteins by fumarate - mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. Ann Ny Acad Sci, 2008, 1126: 272-275
[33] Frizzell N, Lima M, Baynes JW. Succination of proteins in diabetes. Free Radic Res, 2011, 45: 101-109
[34] Zu XL, Besant PG, Imhof A, *et al.* Mass spectrometric analysis of protein histidine phosphorylation. Amino Acids, 2007, 32: 347-357
[35] Attwood PV, Piggott MJ, Zu XL, *et al.* Focus on phosphohistidine. Amino Acids, 2007, 32: 145-156
[36] Shih DT, Jones RT, Shih MF, *et al.* Hemoglobin chico [beta 66(e10)lys----thr]: A new variant with decreased oxygen affinity. Hemoglobin, 1987, 11: 453-464
[37] Sun WY, Smirnow D, Jenkins ML, *et al.* Prothrombin scranton: Substitution of an amino acid residue involved in the binding of na+ (lys-556 to thr) leads to dysprothrombinemia. Thromb Haemost,

2001, 85: 651-654
[38] Van Winkle LJ, Ryznar R. One-carbon metabolism regulates embryonic stem cell fate through epigenetic DNA and histone modifications: Implications for transgenerational metabolic disorders in adults. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 300
[39] Badar A, Arif Z, Alam K. Role of carbamylated biomolecules in human diseases. IUBMB Life, 2018, 70: 267-275
[40] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med, 2006, 10: 389-406